

gb SARS-CoV-2 Multiplex

Kat. č.: 3231-050



generi biotech

ÚČEL POUŽITÍ

Souprava gb SARS-CoV-2 Multiplex umožňuje stanovení přítomnosti viru SARS-CoV-2 (Wuhan coronavirus 2019) na základě multiplexní detekce virových genů E a RdRP. Stanovení vychází z protokolů publikovaných laboratořemi Charité (Berlín) a Institut Pasteur (Paříž).

PRINCIP VYŠETŘENÍ

Vyšetření je založeno na metodice **jednokrokové (one-step) RT-qPCR**. Souprava obsahuje všechny potřebné komponenty pro provedení stanovení.

PRACOVNÍ POSTUP

- 1) Před každým použitím nechte reagentie kompletně rozmraznout, důkladně je promíchejte a krátce stočte.

Provedení izolace RNA

- 2) Přidejte **10 µl EPC Template RNA** (zkumavka se žlutým víčkem) do každé izolační reakce.
- 3) Je doporučeno připravit samostatnou negativní kontrolu izolace s **Deionized Water** jako vzorkem a s **10 µl EPC Template RNA** v reakci.
- 4) Provedtě izolaci RNA podle standardního izolačního protokolu vaší laboratoře.

Provedení RT-qPCR

- 5) Přeneste **10 µl** (* počet vzorků) ze zkumavky **Master Mix OneStep Multi** (zkumavka s modrým víčkem) a **5 µl** (* počet vzorků) **Assay CoV-2 E-RdRP** (zkumavka se zeleným víčkem) do nové zkumavky, řádně promíchejte, stočte a označte datem přípravy. Takto připravíte **kompletní assay**. Se směsí zacházejte dle instrukcí uvedených v kapitole Podmínky skladování a manipulace.

Alternativní krok: Pokud nebyl **EPC Template RNA** přidán do izolace, lze jej použít jako interní pozitivní kontrolu v PCR. V takovém případě pipetujte **0,25 µl** (* počet vzorků) do **kompletní assaye**.

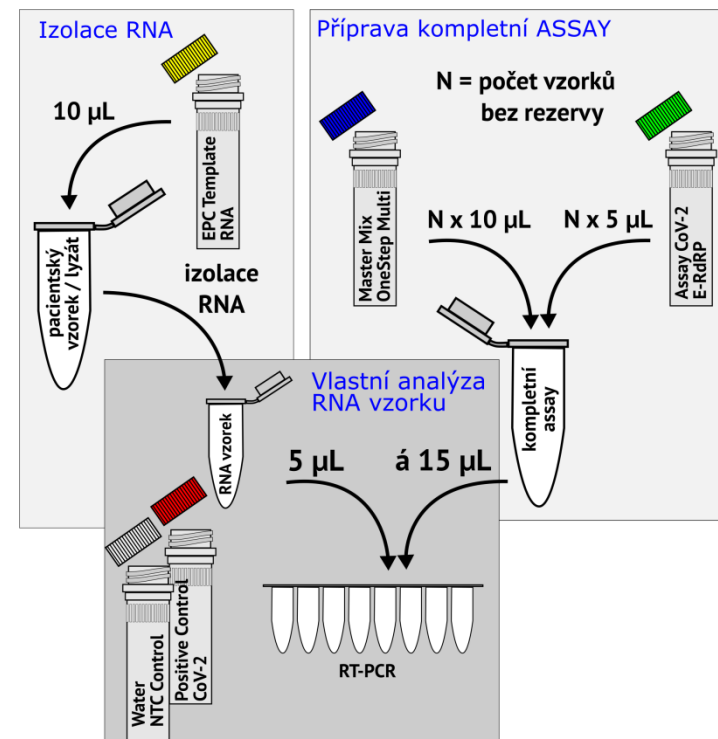
- 6) Připravenou kompletní assay rozpipetujte po **15 µl** do zkumavek určených pro cyklér nebo do jamek plata.
- 7) K assayi přidejte **5 µl** vzorku templátu a krátce stočte.
 - V jednotlivých runech je pro správné vyhodnocení nutná analýza **Positive Control CoV-2** a **Deionized Water** jako NTC kontroly.
 - Jako templát použijte RNA připravenou podle kroků uvedených výše.
 - RNA analyzujte co nejdříve po izolaci.
 - Kontrolu kvality izolované RNA je možné provést pomocí kitu gb Human B2M mRNA (kat. č. 3153).
- 8) Analýzu vzorků v real-time PCR cykléru proveďte bezprostředně po přípravě reakcí.

Amplifikační protokol a sběr dat

- Na real-time PCR cykléru nastavte následující teplotní profil:

reverzní transkripce	42 °C	30 min	50 cyklů
počáteční denaturace	95 °C	3 min	
denaturace	95 °C	10 s	
annealing + elongace (+ snímání fluorescence)	60 °C	30 s	

- Celkový objem PCR reakce je **20 µl**, zohledněte tuto skutečnost při nastavení cykléru.
- Při použití přístroje Rotor-Gene je nutné nastavit **Gain** tak, aby základní fluorescence byla **v rozsahu 5–10 RFU**. **Pozor** – pokud je Gain nastavován před analýzou, teplota optimalizace Gain **nesmí přesáhnout 42 °C**.
- Snímání fluorescence musí být aktivní pro kanály FAM/SYBR, HEX/JOE/VIC a Cy5.
- Návod pro nastavení cykléru před spuštěním analýzy naleznete na adrese: <https://www.generi-biotech.com> v sekci „Ke stažení“ a řiďte se manuálem výrobce daného přístroje.



ANALÝZA VÝSLEDKŮ

Vyhodnocení přítomnosti viru SARS-CoV-2 v testovaném vzorku proveďte na základě analýzy Ct hodnot, které získáte pomocí softwaru vašeho real-time PCR cykléru. Limit detekce* soupravy je 2,1 kopii/rxn.

* limit detekce stanoven probit analýzou na hladině spolehlivosti 95 %

Signál v daném fluorescenčním kanálu odečtete jako hodnotu Ct (threshold cycle, prahový cyklus) v módu kvantifikace. **Ct hodnoty pro virové geny odečtete v kanálech FAM a HEX, Ct hodnoty pro externí pozitivní kontrolu v kanálu Cy5.** U silně pozitivních vzorků nemusí být externí pozitivní kontrola amplifikována. Pro všechny aktivní kanály je nutné pro odečet nastavit **stejnou hodnotu prahové fluorescence** (threshold). Dodržujte instrukce od výrobce cykléru.

Nejprve ověřte validitu analýzy. Zobrazte signály reakcí kontrolních vzorků.

Validita analýzy

Analýza je považována za validní, pokud signály kontrol odpovídají následujícímu rozdělení:

- Positive Control CoV-2 – signály v kanálech FAM/SYBR, HEX/JOE/MIC a Cy5
- Deionized Water jako negativní kontrola izolace – signál v kanálu Cy5
- Deionized Water jako NTC – žádný signál

Pokud je analýza potvrzena jako validní, pokračujte s hodnocením vzorků. V opačném případě postupujte dle doporučení uvedených v kapitole Řešení potíží.

Interpretace výsledků

Konečným výstupem analýzy dat je určení přítomnosti viru SARS-CoV-2 (tj. positivity vzorku).

Výsledek VALIDNÍ	FAM	HEX	Cy5
Pozitivní	+	+	+/-
Negativní	-	-	+
Nízká pozitivita *	Ct ≥ 35	-	+
	-	Ct ≥ 35	+
Pozitivní na jiný virus než SARS-CoV-2 z podrodu Sarbecovirus *	Ct < 35	-	+/-

Výsledek NEVALIDNÍ **	FAM	HEX	Cy5
Selhání izolace nebo se vyskytla inhibice RT-PCR	-	-	-
	Ct ≥ 35	-	-
	-	Ct ≥ 35	-
Nespolehlivý výsledek	-	Ct < 35	+/-

* U těchto výsledků doporučujeme nezávislou analýzu soupravami gb Sarbeco N (primary test) a gb SARS-CoV-2 N (confirmation test) pro ověření přítomnosti viru na základě genu N.

** Kvalitu vzorku je možné ověřit pomocí soupravy gb Human B2M mRNA.

ŘEŠENÍ POTÍŽÍ

Výsledky testování mohou být považovány za správné pouze v případě dodržení instrukcí uváděných v příloženém manuálu. V případě nesprávných výsledků kontrolních vzorků zkontrolujte:

- datum expirace soupravy
- podmínky skladování a manipulace
- nastavení pipet a cykléru

Zjištění:	Návrh řešení:
V reakci negativní kontroly (Deionized Water) je detekován signál v kanálu FAM a/nebo HEX.	Pravděpodobně došlo ke kontaminaci reakcí templátem. Zopakujte analýzu.
V reakci negativní kontroly je pomocí jedné detekční assaye opakovaně detekován signál v kanálu FAM a/nebo HEX.	Pravděpodobně došlo ke kontaminaci assaye templátem. Zopakujte analýzu s novým alikvótem dané assaye.
V reakci negativní kontroly je opakovaně detekován signál všech assayí v kanálu FAM a/nebo HEX.	Pravděpodobně došlo ke kontaminaci komponenty Deionized Water templátem. Zopakujte analýzu s ultračistou vodou z jiného zdroje.
Standard Positive Control nebyl detekován nebo byl detekován pouze v jednom/ve dvou kanálech.	Pravděpodobně došlo k pipetovací chybě. Zopakujte analýzu.
V negativní kontrole izolace byl detekován signál v kanálu FAM a/nebo HEX, avšak v negativní kontrole PCR (NTC) žádný signál detekován nebyl.	Pravděpodobně došlo ke vzájemné kontaminaci mezi vzorky. Připravte nové izoláty RNA.
V negativní kontrole izolace nebyl detekován signál v kanálu Cy5.	EPC Template RNA pravděpodobně nebyl přidán do izolačních reakcí nebo došlo k selhání izolačního postupu. Zopakujte analýzu podle kapitoly Pracovní postup.
U vyšetřovaného vzorku nebyl naměřen signál ani v jednom z kanálů, ačkoliv analýza je vyhodnocena jako validní.	Selhání analýzy bylo pravděpodobně způsobeno inhibicí PCR. Proveďte analýzu s novým izolátem RNA.

SLOŽENÍ A POPIS KOMPONENT SOUPRAVY

Komponenta ¹⁾	Objem	Počet ²⁾	Koncentrace
● Assay CoV-2 E-RdRP	0,25 ml ³⁾	1	4×
● Master Mix OneStep Multi	0,5 ml ³⁾	1	2×
● Positive Control CoV-2	0,2 ml	1	4×
● EPC Template RNA	0,25 ml	2	
○ Deionized Water	1,0 ml	1	

¹⁾ Barva víčka na zkumavce odpovídá typu reagentie.

²⁾ Počet uveden pro balení po 50

³⁾ Objem odpovídá 50 PCR reakcím o objemu 20 µl.

Assay CoV-2 E-RdRP

Assay CoV-2 E-RdRP je směs amplifikačních primerů a fluorescenčně značených sond. Sondy umožňují detekci **virového genu E v kanálu FAM** ($\lambda_{\text{EXCITACE}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EMISE}} = 520 \text{ nm}$); **virového genu RdRP v kanálu HEX** ($\lambda_{\text{EXCITACE}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EMISE}} = 556 \text{ nm}$) a **externí pozitivní kontroly v kanálu Cy5** ($\lambda_{\text{EXCITACE}} = 650 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EMISE}} = 670 \text{ nm}$). V přítomnosti virových genů můžeme tedy zaznamenat až tři signály, zatímco za jejich nepřítomnosti zaznamenáme pouze signál externí pozitivní kontroly v kanálu Cy5. Assay je dodána ve zkumavce se zeleným víčkem. Smícháním s Master Mix OneStep Multi získáte kompletní assay určenou k okamžitému použití.

Master Mix OneStep Multi

Master Mix OneStep ve zkumavce s modrým víčkem je optimalizovaná směs pufu, reverzní transkriptázy, polymerázy a nukleotidů, která je nezbytná pro průběh RT-qPCR.

Positive Control CoV-2

Positive Control CoV-2 slouží jako pozitivní kontrola (standard) k ověření validity analýzy. Je dodána ve zkumavce s červeným víčkem. Při manipulaci s pozitivní kontrolou pracujte tak, aby nedošlo ke kontaminaci jiných částí soupravy a analyzovaných vzorků.

EPC Template RNA

EPC Template RNA představuje externí pozitivní kontrolu pro ověření izolačního procesu. Je dodána ve zkumavce se žlutým víčkem.

Deionized Water

Deionizovaná voda slouží jako negativní kontrola do izolace a jako kontrola bez templátu (NTC – no-template control) v PCR. Je dodána ve zkumavce s transparentním víčkem.

Reagencie a vybavení, které nejsou součástí soupravy

- souprava či reagentie na izolaci virové RNA
- jednorázové plastové zkumavky, stripy nebo plata vhodná pro real-time PCR cyklér
- nastavitelné mikropipety s odpovídajícím rozsahem
- jednorázové pipetovací špičky s filtrem
- laboratorní vortex a centrifuga
- real-time PCR cyklér se softwarem

VAROVÁNÍ A OPATŘENÍ

Podmínky skladování a manipulace

- Po obdržení skladujte všechny komponenty soupravy při teplotě pod **-20 °C**.
- Assay je citlivá na světlo, omezte manipulaci na světle na nejkratší možnou dobu.
- Reagentie jsou určeny pro práci při laboratorní teplotě.
- Jednotlivé komponenty soupravy rozmrazte a znovu zmrazte **maximálně 5×**. Kompletní assay vzniklou po smíchání Master Mix OneStep Multi a Assay CoV-2 E-RdRP již nezmrazujte. Takto vzniklá směs je určená na **jedno použití**.
- Při dodržení uvedených podmínek je souprava stabilní až do data expirace, které je uvedeno na **štítku krabičky**.

Bezpečnostní opatření

- Souprava je určena pouze pro profesionální použití.
- Při práci s RT-qPCR reagentiemi a materiálem noste vždy laboratorní oděv a ochranné rukavice.
- V případě potřísnění pokožky nebo zasažení očí reagentiemi opláchněte postižené místo pod tekoucí vodou.







Instrukce pro použití

- Vždy používejte verzi manuálu, která je součástí soupravy. Číslo odpovídající verze je vyznačeno na štítku uvnitř krabičky.
- Nevhodné zacházení s reagentiemi či úpravy pracovního postupu mohou negativně ovlivnit výsledky, proto je třeba striktně dodržovat pipetované objemy, inkubační doby a teplotní podmínky dle uvedených instrukcí.
- Dodržujte expirační dobu soupravy uvedenou na štítku krabičky.
- Nekombinujte komponenty z různých šarží souprav.
- V případě, že je po doručení některá z komponent soupravy poškozená, nepoužívejte ji a neprodleně kontaktujte výrobce. Uschovejte pro případnou reklamaci.
- Používejte kalibrované pipety a přístroje.
- Likvidaci veškerého odpadu provádějte dle platných právních předpisů. Vnější obal je vyroben z papíru, vnitřní výsek z polyuretanu a zkumavky z polypropylénu. S reagentiemi lze zacházet jako s běžným odpadem. Konečný produkt PCR analýzy likvidujte způsobem zohledňujícím riziko kontaminace prostor.

Opatření k předcházení kontaminace

- Vyhraďte prostory, vybavení, materiál a ochranné pomůcky pro izolaci DNA/RNA z klinického materiálu a jiné pro přípravu RT-qPCR reakcí.
- Vyměňte si rukavice a laboratorní oděv, kdykoli máte podezření, že jsou kontaminovány.
- Nikdy neotvírejte amplifikovaný PCR produkt v místě přípravy PCR reakcí.
- Reagentie nechávejte otevřené jen po dobu nezbytnou k přípravě PCR reakcí.
- Při pipetování použijte špičky s filtrem.
- Při přípravě reakce je třeba věnovat pozornost tomu, aby standardy nekontaminovaly žádnou další součást soupravy nebo ostatní vzorky. Tomu se lze vyhnout uzavřením všech zkumavek před manipulací se standardy.
- Pro ředění vzorků používejte ultračistou vodu. Za tímto účelem je možno využít Deionized Water, která je součástí soupravy.

SYMBOLY POUŽITÉ NA NÁLEPKÁCH

	Číslo šarže
	Datum expirace
	Skladování při doporučené teplotě
	Obsahuje
	Výrobce
	Počet testů

PRODUKTOVÁ ŘADA

gb Sarbeco E (primary test)	Kat. č. 3227
gb SARS-CoV-2 RdRP (confirmation test)	Kat. č. 3228
gb Sarbeco N (primary test)	Kat. č. 3229
gb SARS-CoV-2 N (confirmation test)	Kat. č. 3230
gb Human B2M mRNA	Kat. č. 3153

REFERENCE

Při použití soupravy se řiďte manuálem výrobce daného cykléru. Seznam cyklérů, na kterých byly testovány výkonnostní parametry soupravy, je dostupný na webových stránkách výrobce.

Pokud potřebujete doplňující informace, kontaktujte nás na e-mailové adrese info@generi-biotech.com nebo na telefonním čísle +420 495 056 314. Další informace získáte také na našich webových stránkách www.generi-biotech.com.



GENERI BIOTECH s.r.o.
Machkova 587/42
CZ-500 11, Hradec Králové 11 – Třebeš
CZECH REPUBLIC

www.generi-biotech.com

tel.: +420 495 056 314

e-mail: info@generi-biotech.com

Verze manuálu: 1.4

Datum poslední revize: 25. 8. 2020